家蚕神经系统研究进展

于 奇, 周启升, 刘庆信*
(山东农业大学发育遗传学研究室, 山东泰安 271018)

摘要: 家蚕 *Bombyx mori* 神经系统属于腹神经索型, 构造简单, 却能产生丰富的行为, 是研究神经生物学的理想实验材料。研究表明: 家蚕神经系统由中枢神经系统、外周神经系统和交感神经系统构成, 通过信号传递在调节家蚕视觉、嗅觉、取食、结茧、交配、排泄等生命活动中发挥作用。家蚕具有编码乙酰胆碱、γ-氨基丁酸、多巴胺等多种神经递质及其受体和促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)、滞育激素(diapause hormone, DH)等神经肽的基因。家蚕神经系统发育受到许多基因和 bmo-miR-92 等小分子 RNA 的调控。目前研究家蚕神经的方法主要有触角电位技术、免疫细胞化学法、转基因方法、神经信息学及计算机三维重建等。对家蚕神经系统的研究有助于阐明神经系统的信号传递机制和生物神经网络的形成机制。

关键词: 家蚕; 神经系统; 神经递质; 神经肽; 神经发育
中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)10-1172-09

Advances in the research on the nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*

YU Qi, ZHOU Qi-Sheng, LIU Qing-Xin* (Laboratory of Developmental Genetics, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The silkworm, *Bombyx mori*, has a ventral nerve cord-type nervous system, which is more simple in structure than that of vertebrates; however, the simple system controls the complex behavior of the silkworm. Therefore, *B. mori* is an ideal model animal for neurobiology study. The silkworm nervous system, including the central nervous system, the peripheral nervous system and the sympathetic nervous system, plays a role in the regulation of sight, smell, feeding, cocooning, mating, excretion and other life activities of the silkworm by transferring signals. The genes coding for neurotransmitters, *e.g.*, acetylcholine, γ-aminobutyric acid and dopamine, and neuropeptides, *e.g.*, prothoracicotropic hormone (PTTH) and diapause hormone (DH), were found in the nervous system of the silkworm. The development of the silkworm nervous system is regulated by a variety of genes and MicroRNA, such as bmo-miR-92. At present, the main research methods for silkworm nervous system include electroantennogram, immunocytochemistry, transgenic methods, neuroinformatics, and three-dimensional reconstructions. The research on silkworm nervous system will help to illuminate the signal transmission mechanisms of nervous system and the formation mechanisms of biological neural networks.

Key words: *Bombyx mori*; nervous system; neurotransmitter; neuropeptide; neural development

神经系统是生物体内起主导作用的系统, 它通过调节和控制体内其他各个系统的活动使机体适应复杂多变的外界环境, 从只含有简单网状神经系统的水螅 *Hydra* 到含有上百亿个神经细胞的人类, 生物神经系统的复杂程度随着其进化程度的提高而不断增加; 20 世纪初, Cajal 首先提出了神经元学说, 认为神经系统由独立的神经元组成, 这为神经科学的研究和发展奠定了结构基础(Koch and Laurent, 1999; DeFelipe, 2010)。在神经科学的发展过程中, 模式生物作出了很大贡献, 如秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 在学习记忆和神经系统疾病研究方面的贡献, 果蝇 *Drosophila* 作为经典的遗传学材料在神经细胞发育和神经网络形成研究中发挥了重要作用, 此外, 小鼠 *Mus musculus* 作为最重要的哺乳动物发育生物学的研究模型, 对于理解人类自身的神经生长发育机理和神经疾病发生有很高的

基金项目: 山东省海外高层次人才专项基金项目(72019)
作者简介: 于奇, 女, 1987 年生, 山东青州人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕神经发育, E-mail: yuqsdau@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, Tel.: 0538-8246398; E-mail: liuqingxin@sdau.edu.cn
收稿日期 Received: 2011-01-17; 接受日期 Accepted: 2011-09-15

借鉴意义(Marder, 2002; Harper, 2010; Spindler and Hartenstein, 2010)。而家蚕 *Bombyx mori* 作为一种新型模式生物，具有基础研究历史较长、遗传资源丰富、世代短、子代群体大、易于在实验室饲养、便于进行实验操作和全基因组测序已经完成等特点，是一种理想的生物学实验材料(Xia *et al*., 2004；秦俭等，2010)。与脊椎动物相比，家蚕的神经系统构造简单，却能产生丰富的行为；与果蝇相比，家蚕中枢神经系统拥有的神经分泌细胞极为丰富并且神经细胞较大，在操作过程中神经细胞易于观察和易于直接进行活体实验，家蚕的基因组较大且比果蝇进化程度高，家蚕具有的神经系统特异基因有望成为鳞翅目害虫防治的靶标基因，家蚕 40 个品种的基因组序列为神经系统进化方面的研究提供了丰富的材料(Xia *et al*., 2009；秦俭等，2010)。因此，以家蚕作为分析神经元功能的优秀模型，对揭示生物神经网络的形成机制具有非常重要的意义。

对家蚕神经系统的研究已有很长的历史，Ke(1932)和 Kuwana(1932)首次描述了家蚕背血管神经的解剖学特点；Kobayashi(1957)将家蚕脑神经分泌细胞分为中央群和侧群，并把中央群分泌细胞分为 A 和 B 两类，而夏振铎和徐静斐(1964)认为除中央群和侧群外，还存在着后群及腹侧群，脑内共有八群神经分泌细胞。近年来，随着生物技术的进步，家蚕神经的研究已经从形态学发展到分子生物学及行为科学等领域，家蚕已成为昆虫嗅觉研究的模型。由于昆虫与脊椎动物的神经活动原理有很多相似性，因此，可以通过对家蚕神经系统模型的研究了解人类神经疾病基因之间的相互作用及与疾病发生的关系；另外，在农业害虫防治中，神经系统是杀虫剂的主要作用靶标，通过对家蚕神经系统的研究将有助于开发以昆虫神经系统为靶标的新型杀虫剂。本文简要介绍了家蚕神经系统的基本构造和功能，并对近年来家蚕神经系统在信号传递、发育调控及研究方法等方面的进展进行了综述，同时对今后家蚕神经系统在昆虫嗅觉研究模型、人类神经疾病研究模型和杀虫剂靶基因等方面的研究及应用进行了展望。

1　家蚕神经系统构造及功能

家蚕神经系统属于腹神经索型，由神经元和神经胶质细胞构成，根据解剖学特点分为中枢神经系统、外周神经系统和交感神经系统。幼虫的中枢神经系统由 13 对神经节(包括脑神经节、咽下神经节、3 对胸部神经节和 8 对腹部神经节)和连接相邻神经节的神经索组成；外周神经系统由上唇神经、触角神经、视神经等头部外周神经和胸腹部外周神经组成；交感神经系统由头部交感神经、咽侧交感神经和胸腹部交感神经组成(图 1)。

在胚胎发育过程中，家蚕神经系统由外胚层细胞发育而来，丙 2 胚子时在颚节纵轴位置上出现神经组织的最初分化处，丁 1 胚子时神经沟纵贯胚子腹中线(孙承铣，1964)，在沟两侧的各节外胚层中，数个大型的神经细胞不断分裂增殖，分别在各节中形成 1 对细胞群，以后发育成神经节，其中在头叶的神经节将来发育成脑，中枢神经系统先形成，然后分支出神经形成外周神经和交感神经。蚁蚕的神经系统在位置、形态上与大蚕相似，但与大蚕相比，显得较简单，神经节成球状，成双的神经索分开较明显，外周神经及交感神经分枝少而短，还很不发达。在蛹的早期，共有 13 个神经节，后来腹部的 8 对神经节融合为 4 对。成虫共有 9 对神经节，腹部也有 4 对神经节，脑特别发达，咽侧神经索缩短，脑侧发出粗大的视神经与复眼相连，成虫不具有幼虫期的交感神经网，但在神经索的两侧发出多数神经，形成三角形。

家蚕神经系统的活动构成了家蚕视觉、嗅觉、取食、结茧、交配、排泄等生命活动的基础。家蚕中枢神经系统是感觉和运动的协调中心，家蚕大脑控制其他神经节的活动，并通过激素和神经连锁两种方法调节眠性和滞育性；吴大洋等(1993)采用实验形态学的方法，在化蛹前将家蚕老熟幼虫的咽下神经节摘除，发现在蛹体发育过程中，卵巢中甘油三酯、游离脂肪酸等脂质的相对含量减少，而脂肪体、血液中的脂质积累量增加，该实验结果表明咽下神经节对蛹期脂质在脂肪体、血液及卵巢等组织器官中的转运和积蓄具有一定的调节作用；胸腹部神经节有相对的自主性，如第 2 胸节到第 1 腹节的神经节是全身肌肉运动的中枢。外周神经控制取食、呼吸、生殖及内脏器官的活动。交感神经主要控制内脏器官和腺体的活动，如回神经对咽喉和食道运动有支配作用，腹部的交感神经对气门开闭和背血管的搏动有控制作用。触角叶局域中间神经元(local interneuron)在家蚕嗅觉信息传递中发挥着重要作用，用免疫细胞化学方法检验蚕蛾的触角神经叶局部中间神经元，依据在触角神经叶的分支区域

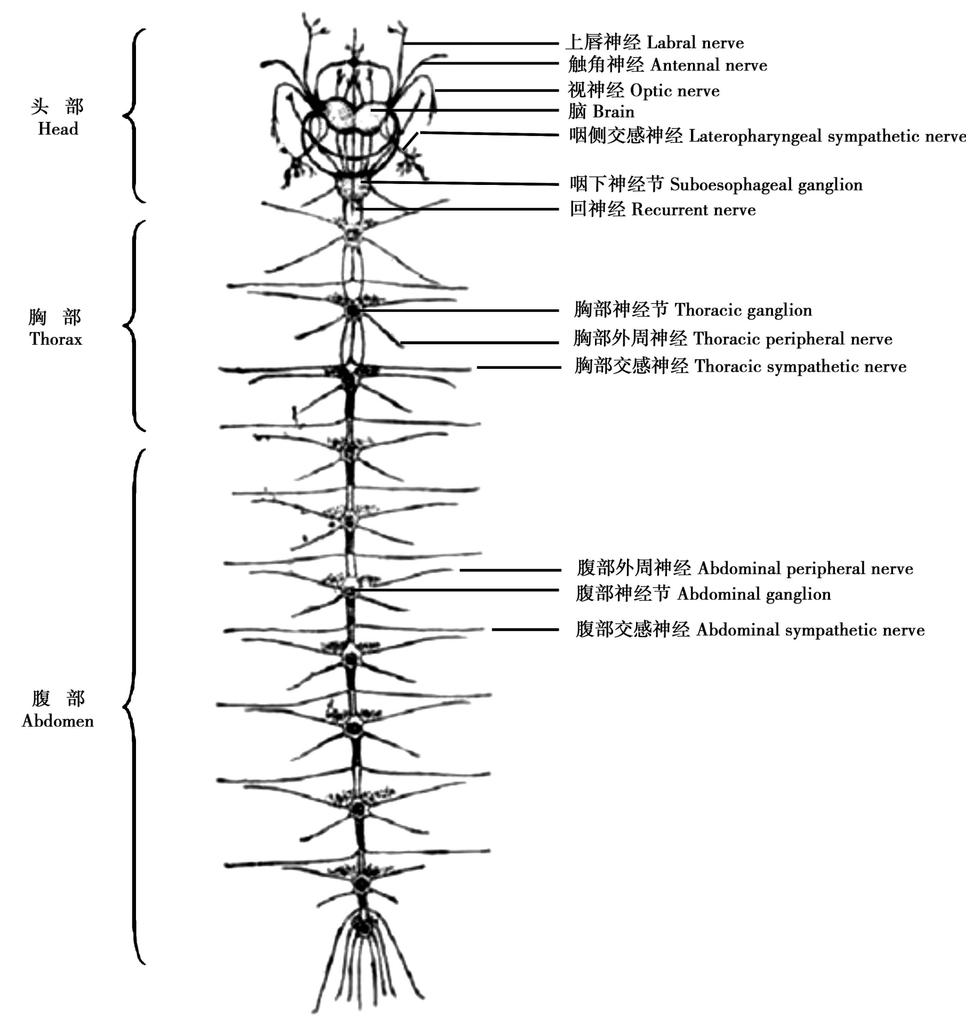


图 1 家蚕幼虫神经系统模式图(引自吴载德等, 1995)

Fig. 1 The anatomical structure of nervous system in larva of the silkworm, *Bombyx mori* (adopted from Wu *et al*., 1995)

和树状突的形态将其分为 5 个形态类型(Seki and Kanzaki, 2008)。Kanzaki 等(2003)对家蚕雄蛾触角叶嗅球复合体(macroglomerular complex, MGC)进行了计算机三维重建, 发现 MGC 区的投射神经元是通过 3 种不同的大脑触角脑束向前脑下侧的内侧部传输信息。主导昆虫具体行为的往往是大脑中的一小群神经元, 因此研究神经系统的功能需要从研究单个神经元开始, 通过分析神经元的结构来分析神经网络和信息传播的机制。Nakajima 等(2009)采用图像处理技术和统计学方法比较了家蚕蛾脑前运动神经元的形状和结构, 认为有相同的形状不一定有相同的结构, 在神经元的形状和功能之间没有必然的关系, 应该用神经的结构而不是形状来阐明神经元的功能。

2 家蚕神经系统中的信号传递

神经系统的主要功能是信息传递, 目前研究发现, 在家蚕体内参与实现神经系统信息传递功能的生物活性物质有神经递质、离子通道和神经肽等。

2.1 神经递质

神经递质(neurotransmitter)是指在突触中担任信息信使的、由一个神经元末梢释放并作用于另外一个神经元细胞膜而导致神经元兴奋或抑制的物质, 大多数神经递质在突触囊泡贮存(Stevens, 2003; Edwards, 2007)。自从 Loewi(1921)在蛙心离体灌流试验中获得第一种神经递质乙酰胆碱以后, 神经递质及其受体的研究取得了迅速的发展, 有越来越多的物质被确定为神经递质, 目前家蚕中已发现的神经递质主要有胆碱类、氨基酸类和单胺类。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是胆碱能神经的化学递质, 其受体分为烟碱型受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)和毒蕈碱型受体(muscarinic acetylcholine receptor, mAChR)。在家蚕中, 感觉神经元是胆碱能的, 传出神经是非胆碱

能的，Shao 等(2007)克隆了 12 个编码家蚕 nAChR 亚基的基因，其中 9 个亚基为 α 型，3 个亚基为 β 型，是目前已知最大的昆虫烟碱型受体基因家族。Shang 等(2007)对家蚕乙酰胆碱酯酶的生化特性进行了研究并首次克隆到编码家蚕乙酰胆碱酯酶的 2 个基因 *Bmace1* 和 *Bmace2*，为家蚕乙酰胆碱酯酶的双基因编码提供了直接的证据。γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid，GABA)是一种抑制性氨基酸类神经递质，其受体在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 中都已被发现，家蚕是第 4 个探明 GABA 受体家族全部成员的昆虫，包括 3 个 RDL，1 个 LCCH3 和 1 个 GRD，这是目前昆虫中最大的 GABA 受体家族(Yu *et al*.，2010)。多巴胺(dopamine，DA)能调节人的躯体活动和精神活动等，在家蚕幼虫和蛹的大脑和咽下神经节的神经分泌细胞发现了多巴胺(Takeda *et al*.，1986)。Mitsumasu 等(2008)从蛹的脑-咽下神经节中克隆了多巴胺受体基因 *BmDopR1* 和 *BmDopR2*。章鱼胺(octopamine，OA)首先在章鱼的唾腺中发现，广泛存在于各种昆虫的神经系统中，其生理作用相当于脊椎动物的肾上腺素和去甲肾上腺素，从家蚕幼虫的神经组织克隆到了 α-肾上腺素样章鱼胺受体基因 *BmOAR1* 和 β-肾上腺素样章鱼胺受体基因 *BmOAR2*(Ohtani *et al*.，2006；Chen *et al*.，2010)。酪胺(tyramine，TA)是无脊椎动物体内的一种生物胺，Huang 等(2009)从家蚕神经组织克隆到酪胺受体基因 *BmTAR2*，并对该受体的功能和药理特性进行了研究，认为 TA 在家蚕中起着神经递质和调质的作用。

2.2　离子通道

离子通道(ion channel)是介导电信号的跨膜蛋白所形成的孔道，离子通道在膜电位改变或与神经递质结合后开放，允许 Na^+，K^+，Ca^{2+} 或 Cl^- 离子通过，因此，离子通道分为电压门控离子通道和配体门控离子通道(Collingridge *et al*.，2009；Catterall，2010)。何琳(2007)获得了 GABA 门控氯离子通道 α 亚基基因的全长 cDNA 序列和钠离子通道 α 亚基的部分 cDNA 序列。Shao 等(2009)克隆了家蚕电压门控钠通道基因 *BmNav*。

2.3　神经肽

神经肽(neuropeptide)是指生物体内主要起传递信息作用的生物活性多肽，主要分布在神经组织，也存在于其他的组织内，神经肽将神经系统和内分泌系统两种信息传递方式结合起来，共同调节机体各器官的活动(Hökfelt *et al*.，2000；Nässel and Winther，2010)。家蚕中分泌神经肽的器官主要是脑、咽下神经节及其他神经节内的神经分泌细胞，家蚕神经肽主要有促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone，PTTH)、抑前胸腺肽(prothoracicostatic peptide，PTSP)、滞育激素(diapause hormone，DH)、保幼激素(juvenile hormone，JH)、信息素生物合成活化神经肽(pheromone biosynthesis activating neuropeptide，PBAN)和离子转运肽(ion transport peptide，ITP)等，很多家蚕神经肽已被分离纯化且其化学和生物学特性也已描述，关于家蚕经肽基因的克隆、功能及其调控基因的研究也有很多报道(Zhang *et al*.，2004；Shiomi *et al*.，2005；Dai *et al*.，2007；Li *et al*.，2009)。

家蚕 PTTH 由脑侧后方的 2 对神经细胞分泌，其功能主要是作用于前胸腺，通过调节蜕皮激素的释放调控家蚕的生长、发育、蜕皮与变态等生理过程(Kawakami *et al*.，1990)。Hua 等(1999)从家蚕脑中分离鉴定 PTSP，提出并证实了类固醇激素生物合成中神经调控复杂性的一个新机制，即昆虫蜕皮激素的生物合成受到 PTTH 正调控和 PTSP 负调控的协同作用。魏兆军等(2008)利用高糖抽提缓冲液从家蚕脑组织中抽提核蛋白，发现脑核蛋白可以与 PTTH 转录起始位点附件 119 bp 的序列特异地结合，这是首次检测到家蚕 PTTH 启动子可以与转录因子特异结合。家蚕 *torso* 主要表达在 5 龄幼虫的前胸腺，用家蚕 PTTH 刺激转染了家蚕 *torso* 和果蝇 ERK 的果蝇 S2 细胞，导致细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase，ERK)的磷酸化，而在没有 PTTH 或者有 PTTH 而没有表达家蚕 *torso* 的对照组中，ERK 没有被激活；通过果蝇的 *torso* 或者胰岛素受体，家蚕的 PTTH 并没有激活 ERK，说明家蚕 PTTH 对 ERK 的激活对家蚕 *torso* 有特异性，这个实验结果说明 Torso 是 PTTH 的受体，能够通过激活 ERK 通路调节 PTTH 信号(Rewitz *et al*.，2009)。Na 等(2004)用神经肽 FMRF 酰胺(FMRFamide)抗体对家蚕腹神经节和后肠的神经细胞进行染色，结果发现在腹部第 1 ~ 7 神经节有 FMRF 酰胺标记细胞，但是标记的传出神经元没有到达后肠，和后肠没有神经元的连接；在第 8 神经节，有 3 对标记的传出神经轴突延伸到中央神经纤维网，最后支配后肠，这为研究 FMRF 酰胺相关肽在家蚕中的新功能提供了参考。Roller 等(2008)通过对家蚕基因组序列的同源性检索和

cDNA 末端快速扩增法在家蚕中新注解了 23 个神经肽基因和 3 个基因的剪接变异体，与已有的昆虫神经肽基因比较显示，在家蚕中除了原肠肽、后叶加压素类肽和神经肽样蛋白前体 2 没有发现外，家蚕基因组包含了大多数保守的神经肽基因，家蚕神经肽显示了独特的基因重复，同时克隆了编码 CCHamide 的新基因，并且在家蚕中第一次发现了利尿激素（diuretic hormone）和心动加速肽 2b（cardioacceleratory peptides 2b，CAP2b）的不同剪接形式。甘玲等（2010）利用已研究报道的昆虫神经肽与家蚕神经肽之间的同源性对家蚕基因数据库进行了全面而系统的神经肽基因筛查和成熟肽的预测，共获得 31 个神经肽基因家族，具体为 37 个神经肽基因亚家族和 44 个神经肽基因，并通过软件分析结合与已知昆虫或无脊椎动物神经肽的同源性，预测出了 193 个成熟的神经肽。

3 家蚕神经发育及调控的研究

神经发育是当前神经科学研究领域中的一个热点，神经系统的发育是一个及其复杂的过程，受到多重环节、多种因素的调节（Liu *et al*., 2009；Muotri *et al*., 2010）。自 Gehring（1987）发现果蝇神经系统发育同源盒基因以来，许多重要的神经系统发育调控基因被陆续发现，现已证实，动物神经系统的发育过程是一个级联式基因调控过程，寻找神经发育相关基因，分析它们在神经发育的哪个阶段行使功能，有助于了解神经发育的分子机制（Nicholls *et al*., 2003）。有关家蚕神经发育的研究报道相对较少，神经发育相关基因的功能研究还不是很深入。

在家蚕中，已获得了参与果蝇神经系统发育的 *AS-C*、*dme-miR-92a* 和 *e*（*spl*）*m4* 基因的同源基因 *Bm-ASH1*，*Bm-ASH2*，*Bm-ASH3*，*Bm-ase*，*bmo-miR-92* 和 *BmEm4*（Yu *et al*., 2008；Zhou *et al*., 2008；Zeng *et al*., 2009）。20-羟基蜕皮甾酮（20-hydroxyecdysterone，20-HE）能够激发 *bombeil-2* 基因在大脑细胞中的表达，对 *bombeil-2* 基因的 RNAi 试验显示其影响幼虫化蛹过程中大脑的发育（Hossain *et al*., 2008）。家蚕 *BmCREB* 基因在 5 龄幼虫和蛹期的中枢神经系统中均有表达，主要分布在脑和神经节的胞体密集区；在发育的各个阶段，*BmCREB* mRNA 在滞育型蚕的表达水平比非滞育型的高，在滞育型中，胚胎和蛹期有表达峰，而在非滞育型的中则没有，这些结果说明 CREB 蛋白可能与滞育信号有关（Song *et al*., 2009）。

触角神经叶是昆虫的初级嗅觉中心，是昆虫中脑的主要组成部分，已有研究表明在体外培养条件下，含有 20-HE 的培养基中投射神经元突起明显延长，蛹期第 5 天，低滴度 20-HE 培养的触角叶神经元比高滴度培养的有更高的存活率，同样条件下培养，第 7 天的触角叶神经元的存活率比第 5 天的低；含有 5-羟色胺（5-hydroxy tryptamine，5-HT）的培养基中多极神经元从主要突起形成的新分支明显增加（Park *et al*., 2003）。在原代培养中，人的脑源性神经营养因子（brain derived neurophic factor，BDNF）能促进家蚕触角叶投射神经元突起的延伸和触角叶中间神经元主要突起分支的生长，同时也增大了触角叶神经元的存活率，BDNF 的促进作用明显大于作为对照的 20-HE 和 5-HT 的影响；对家蚕大脑和脑后方复合体的免疫细胞化学及对血液的酶联免疫吸附试验显示，家蚕 BDNF 样神经肽在大脑中央群和侧群神经分泌细胞合成，且中央群神经分泌细胞比 6 对侧群神经分泌细胞染色深，标记的中央群神经分泌细胞轴突延伸到对侧的咽侧体，标记的侧群神经分泌细胞轴突延伸到同侧的咽侧体，BDNF 样神经肽被运送到咽侧体储存，最终分泌到血液中起作用（Park *et al*., 2004；Kim *et al*., 2005）。

Li 等（2010）采用鸟枪法对 5 龄第 5 天家蚕的头进行蛋白质谱分析，鉴定的蛋白中包括几种家蚕神经系统发育相关蛋白，在神经递质的分泌、成神经细胞不对称分裂、轴突导向和延伸等方面发挥作用，并且许多蛋白质与人类的涉及神经退行性疾病途径的蛋白有高度同源性。

4 家蚕神经的研究方法

以上各类研究成果的取得大多依赖于先进的实验方法和技术手段，家蚕中常用的神经生物学研究技术有电生理学方法、免疫细胞化学法等，也可用转基因的方法来分析在神经系统表达基因的功能，此外，近年来神经科学与信息学和计算机科学相结合，为揭开神经系统的本质开拓了新途径。

4.1 电生理学方法

电生理学方法可用来研究生物组织中存在的生物电现象，包括神经元染色法、神经跟踪技术、细胞内记录、电压钳技术、脑成像等方法，在神经科学研究中发挥着独特的作用。触角电位技术

(electroantennogram，EAG)是化学生态学中最常应用的电生理学方法，该技术首先被用于记录家蚕的触角反应(Schneider，1957)，后来与气相色谱联用，广泛应用于昆虫信息素的成分和结构鉴定中。细胞内记录(intracellular recording)也是一种电生理方法，是将玻璃微电极插入到细胞内的记录方法，如 Sasaki 和 Asaoka(2005)用细胞内记录的方法研究了家蚕近颚处运动神经元的不同生理特性并按功能进行了分组。

4.2　免疫细胞化学法

免疫细胞化学法(immunocytochemistry)是用标记的特异性抗体对组织内抗原的分布进行定位的一种方法，将某种标记物质结合到抗体上，然后在组织切片上鉴别是否发生了特异的抗原抗体反应，并可对与抗体结合的抗原物种进行定位。免疫细胞化学技术作为一种化学神经解剖学方法，具有高度的特异性、灵敏性和精确性，在研究家蚕神经结构及神经组织特异性蛋白分布方面发挥了重要作用。

4.3　转基因方法

转基因技术是分析基因功能的重要方法之一，经过诸多研究人员的探索与研究，家蚕转基因技术体系日趋成熟，在制作方法、载体、报告基因等方面都有了很大进展，通过现在的家蚕转基因技术，获得转基因家蚕的成功率已经达到40%。Yamagata 等(2008)利用 *GAL4/UAS* 系统，其中 *GAL4* 的表达在家蚕素或促前胸腺激素的启动子控制下，同时用 GFP 标记，结果显示表达 *GAL4/UAS* 系统的神经分泌细胞有绿色荧光出现，这个实验提供了一种能看到特定的神经细胞亚群和观察单个神经元精细结构的新方法。Daubnerová 等(2009)用转基因方法来分析家蚕肽能神经元的功能，其研究结果表明 AcMNPV 载体可有效地实现外源基因在家蚕幼虫和蛹的肽能神经元及内分泌细胞的转移和表达，核多角体病毒和其他病毒载体的瞬时基因表达可用来分析神经内分泌过程的分子机制。转基因家蚕制作较容易，因此可以用转基因的方法来研究家蚕神经系统相关基因的功能。

4.4　神经相关数据库的建立

神经活动是最复杂的生命现象之一，神经组织基因表达的数目远远超过其他组织，随着神经分子生物学的深入研究，生成了大量数据，神经系统基因数据库及实验数据存储共享数据库的构建显得十分必要。Kazawa 等(2008)开发了家蚕神经元数据库(*Bombyx* Neuron Database，BoND)，这个数据库整合了家蚕神经在形态学、生理学和免疫组化等各个领域的研究结果，集合和共享实验及分析数据，这有助于理解神经网络机制。此外，有关家蚕神经的生物信息学也可以从美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information，NCBI)、家蚕基因组数据库(Silkworm Genome Database，SilkDB)、SilkBase 和 KAIKObase 等数据库中获得。

4.5　三维重建

三维重建(three-dimensional reconstruction，3D)是运用计算机图形学和图像处理技术将所得到的断层二维图像序列在计算机中重建成三维图像，并在屏幕上形象逼真地显示立体视图，通过人机交互，可以对重建的图像进行旋转、切割、缩放等操作，使人们能够更充分地理解重构物体的三维结构关系和不同组成部分的接近程度，进而揭示功能的相关性(Hakim *et al.*，2010)。Lein 等(2007)通过三维重建获得了成年小鼠大脑中 20 000 个基因表达模式的解剖学全面数字图谱，这种技术也可以应用在家蚕神经的研究中。

5　小结与展望

近几年家蚕神经系统的研究已经取得了一定的进展，电生理学方法、免疫细胞化学法、转基因方法及生物信息学和计算机科学的应用，尤其是从分子水平上对家蚕神经生物学的研究，极大地促进了家蚕神经的研究。家蚕神经递质及其受体、离子通道和神经肽的研究有利于阐明神经信号传递机制。有关家蚕神经系统发育的研究报道较少，体外培养条件下 20-羟基蜕皮甾酮、5-羟色胺和脑源性神经营养因子能促进家蚕触角叶神经元的生长和增大其存活率，同源性检索发现家蚕中存在果蝇神经发育调控基因的同源基因。

家蚕神经系统的研究丰富了神经科学的内容，但仍存在很多问题需要解决，今后家蚕神经可以从以下几个方面进行研究：(1)家蚕脑是一个分析关于刺激引起行为的神经机制的模型系统，以家蚕作为昆虫嗅觉研究的模型，进一步研究昆虫化学感受的分子机制。(2)展开对家蚕神经系统发育机制的研究。目前，神经系统发育的研究主要是在线虫、果蝇、非洲爪蟾、小鼠等模式动物中开展的，其中部分领域的研究已取得重要进展，但有关神经发育生物学的很多重要科学问题还没有解决，如神经系

统的高度特异性联系模式的产生机制、神经系统损伤后的再生机理等，可以通过对家蚕神经生长导向因子进行研究，来揭示信号分子在神经发育中的功能。另外，家蚕在基础物质代谢、能量代谢和遗传方式上与人有很大的相似性，分化程度较果蝇高，因此，家蚕可作为人类神经疾病研究的模型，如异常神经传导模型，通过对这些家蚕突变体基因异常序列的表达、调控进行分析，将为人类神经疾病相关基因功能的研究提供理论参考。(3)寻找杀虫剂在神经系统作用的靶点基因。很多杀虫剂是神经毒剂，通过影响轴突传导或乙酰胆碱受体等起作用，通过对家蚕神经系统的研究，可以实现从基因水平上阐释杀虫剂作用机理和昆虫抗药性产生的分子机理，从而提高对害虫的防治水平。(4)改善家蚕神经研究方法。目前对家蚕神经缺乏系统的研究，随着家蚕转基因技术的日趋成熟(周启升等，2011)，在线虫、果蝇、小鼠等模式动物中应用的基因敲除(尹海芳等，2002)、基因过量表达、脑损伤法和药物注射法等方法有望在家蚕神经研究中得到应用。

参 考 文 献 (References)

Catterall WA, 2010. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6): 915 – 928.

Chen X, Ohta H, Ozoe F, Miyazawa K, Huang J, Ozoe Y, 2010. Functional and pharmacological characterization of a β-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(6): 476 – 486.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M, 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56 (1): 2 – 5.

Dai L, Zitnan D, Adams ME, 2007. Strategic expression of ion transport peptide gene products in central and peripheral neurons of insects. *J. Comp. Neurol.*, 500(2): 353 – 367.

Daubnerová I, Roller L, Žitňan D, 2009. Transgenesis approaches for functional analysis of peptidergic cells in the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 162(1): 36 – 42.

DeFelipe J, 2010. From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science*, 330(6008): 1198 – 1201.

Edwards RH, 2007. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron*, 55(6): 835 – 858.

Gan L, Liang JB, Liu XL, He NJ, 2010. Neuropeptide gene screening and mature peptide prediction in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 9 – 19. [甘玲, 梁九波, 刘喜龙, 何宁佳, 2010. 家蚕神经肽基因的筛查及成熟肽的预测. 昆虫学报, 53(1): 9 – 19]

Gehring WJ, 1987. Homeo boxes in the study of development. *Science*, 236(4806): 1245 – 1252.

Hakim O, Sung MH, Hager GL, 2010. 3D shortcuts to gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22(3): 305 – 313.

Harper A, 2010. Mouse models of neurological disorders – a comparison of heritable and acquired traits. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802 (10): 785 – 795.

He L, 2007. Gene Cloning and Functional Study of Insecticides Targets in Central Neuronal System in *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing. 44 – 54. [何琳, 2007. 家蚕神经系统靶点基因克隆与功能研究. 北京: 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态所博士学位论文. 44 – 54]

Hökfelt T, Broberger C, Xu ZQ, Sergeyev V, Ubink R, Diez M, 2000. Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacology*, 39 (8): 1337 – 1356.

Hossain M, Shimizu S, Matsuki M, Imamura M, Sakurai S, Iwami M, 2008. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(11): 1001 – 1007.

Hua YJ, Tanaka Y, Nakamura K, Sakakibara M, Nagata S, Kataoka H, 1999. Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274(44): 31169 – 31173.

Huang J, Ohta H, Inoue N, Takao H, Kita T, Ozoe F, Ozoe Y, 2009. Molecular cloning and pharmacological characterization of a *Bombyx mori* tyramine receptor selectively coupled to intracellular calcium mobilization. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(11): 842 – 849.

Kanzaki R, Soo K, Seki Y, Wada S, 2003. Projections to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male silkmoth. *Chem. Senses*, 28 (2): 113 – 130.

Kawakami A, Kataoka H, Oka T, Mizoguchi A, Kimura-Kawakami M, Adachi T, Iwami M, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H, 1990. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 247(4948): 1333 – 1335.

Kazawa T, Ikeno H, Kanzaki R, 2008. Development and application of a neuroinformatics environment for neuroscience and neuroethology. *Neural Networks*, 21(8): 1047 – 1055.

Ke O, 1932. Contributions to the anatomy and physiology of the dorsal vessel of the silkworm. *Bull. Sci. Fak. Terk. Kjusu Univ.*, 5: 1 – 16.

Kim JH, Sung DK, Park CW, Park HH, Park C, Jeon SH, Kang PD, Kwon OY, Lee BH, 2005. Brain-derived neurotrophic factor promotes neurite growth and survival of antennal lobe neurons in brain from the silk moth, *Bombyx mori in vitro*. *Zool. Sci.*, 22(3): 333 – 342.

Kobayashi S, 1957. A study on the neurosecretion in the silkworm *Bombyx mori*. *The Report of Sericultural Experiment Station*, 15 (3): 181 – 273. [小林勝利, 1957. 家蚕の神経分泌に関する研究. 蚕糸試験場報告, 15:181 – 273]

Koch C, Laurent G, 1999. Complexity and the nervous system. *Science*, 284(5411): 96 – 98.

Kuwana Z, 1932. Morphological studies of the nervous system of the

silkworm *Bombyx mori* Linné. I. The innervation of the dorsal vessel. *Bull. Imp. Seric. Expt. Stat.*, 8: 109 – 120.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N *et al.*, 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124): 168 – 176.

Li JY, Chen X, Fan W, Hosseini Moghaddam SH, Chen M, Zhou ZH, Yang HJ, Chen JE, Zhong BX, 2009. Proteomic and bioinformatic analysis on endocrine organs of domesticated silkworm, *Bombyx mori* L. for a comprehensive understanding of their roles and relations. *J. Proteome Res.*, 8(6): 2620 – 2632.

Li JY, Moghaddam SH, Chen X, Chen M, Zhong BX, 2010. Shotgun strategy-based proteome profiling analysis on the head of silkworm *Bombyx mori*. *Amino Acids*, 39(3): 751 – 761.

Liu QX, Hiramoto M, Ueda H, Gojobori T, Hiromi Y, Hirose S, 2009. Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems. *Genes Dev.*, 23(10): 1165 – 1170.

Loewi O, 1921. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.*, 189: 239 – 242.

Marder E, 2002. Non-mammalian models for studying neural development and function. *Nature*, 417(6886): 318 – 321.

Mitsumasu K, Ohta H, Tsuchihara K, Asaoka K, Ozoe Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2008. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding dopamine receptor-1 and -2 from brain-suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 17(2): 185 – 195.

Muotri AR, Marchetto MCN, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, Gage FH, 2010. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*, 468(7322): 443 – 446.

Na SY, Sung DK, Kim KK, Kim KM, Kim JH, Park HH, Lee SM, Seong S II, Chang JS, Hwang JS, Kang SW, Kim HR, Lee BH, 2004. FMRFamide-expressing efferent neurons in eighth abdominal ganglion innervate hindgut in the silkworm, *Bombyx mori*. *Zool. Sci.*, 21(8): 805 – 811.

Nakajima K, Morishita S, Asama H, Kazawa T, Kanzaki R, Mishima T, 2009. Structural comparison of premotor neurons in silkworm moths. *Forma*, 24: 67 – 78.

Nässel DR, Winther ÅME, 2010. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Prog. Neurobiol.*, 92(1): 42 – 104.

Nicholls JG, Martin AR, Wallace BG, Fuchs PA (translated by Yang XL, Tan DP, Ye B, Jiang ZY, Luo DG, Xu HP, Zhao JW, Li GL, Liu J, Huang H, Xu LY, Dong J, Jiang H, Shen Y, Chen L, Tian M, Lu XH, Liu DT, Yu YC), 2003. From Neuron to Brain. Science Press, Beijing. 569 – 572. [尼克尔斯 JG，马丁 AR，华莱士 BG，富克斯 PA（杨雄里，谭德培，叶冰，蒋正尧，罗冬根，徐红平，赵经纬，李耕林，刘剑，黄海，徐丽娅，董静，姜宏，沈吟，陈凌，田苗，陆欣华，刘丹婷，禹永春译），2003. 神经生物学——从神经元到脑. 北京：科学出版社. 569 – 572]

Ohtani A, Arai Y, Ozoe F, Ohta H, Narusuye K, Huang J, Enomoto K, Kataoka H, Hirota A, Ozoe Y, 2006. Molecular cloning and heterologous expression of an α-adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 15(6): 763 – 772.

Park CW, Kim JH, Kim KM, Hwang JS, Kang SW, Kang HS, Cho BP, Yu CH, Kim HR, Lee BH, 2004. Evidence for brain-derived neurotrophic factor-like neuropeptide in brain of the silk moth *Bombyx mori* during postembryonic periods. *Peptides*, 25(11): 1891 – 1897.

Park HH, Park C, Kim KS, Kwon OS, Han SS, Hwang JS, Lee SM, Seong S II, Kang SW, Kim HR, Lee BH, 2003. Effects of 20-hydroxyecdysone and serotonin on neurite growth and survival rate of antennal lobe neurons in pupal stage of the silk moth *Bombyx mori in vitro*. *Zool. Sci.*, 20(2): 111 – 119.

Qin J, He NJ, Xiang ZH, 2010. Advances in silkworm modeling research. *Science of Sericulture*, 36(4): 645 – 649. [秦俭，何宁佳，向仲怀，2010. 家蚕模式化研究进展. 蚕业科学，36(4): 645 – 649]

Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB, 2009. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase Torso to initiate metamorphosis. *Science*, 326(5958): 1403 – 1405.

Roller L, Yamanaka N, Watanabe K, Daubnerová I, Žitňan D, Kataoka H, Tanaka Y, 2008. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1147 – 1157.

Sasaki K, Asaoka K, 2005. Different physiological properties in a pool of mandibular closer motor neurons in a caterpillar, *Bombyx mori*. *Neurosci. Lett.*, 374(3): 166 – 170.

Schneider D, 1957. Elektrophysiologische untersuchungen von chemo- und mechanorezeptoren der antenne des seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 40: 8 – 41.

Seki Y, Kanzaki R, 2008. Comprehensive morphological identification and GABA immunocytochemistry of antennal lobe local interneurons in *Bombyx mori*. *J. Comp. Neurol.*, 506(1): 93 – 107.

Shang JY, Shao YM, Lang GJ, Yuan G, Tang ZH, Zhang CX, 2007. Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells. *Insect Science*, 14: 443 – 449.

Shao YM, Dong K, Tang ZH, Zhang CX, 2009. Molecular characterization of a sodium channel gene from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(2): 145 – 151.

Shao YM, Dong K, Zhang CX, 2007. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 8: 324 – 333.

Shiomi K, Fujiwara Y, Atsumi T, Kajiura Z, Nakagaki M, Tanaka Y, Mizoguchi A, Yaginuma T, Yamashita O, 2005. Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) is a key modulator of the expression of the prothoracicotropic hormone gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS J.*, 272(15): 3853 – 3862.

Song HS, Sun Y, Zhang Y, Li MW, 2009. Molecular cloning and characterization of *Bombyx mori* CREB gene. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71(1): 31 – 44.

Spindler SR, Hartenstein V, 2010. The *Drosophila* neural lineages: a model system to study brain development and circuitry. *Dev. Genes Evol.*, 220(1 – 2): 1 – 10.

Stevens CF, 2003. Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*, 40: 381 – 388.

Sun CX, 1964. A study on morphological development of the head in

embryo of silkworm *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 2(1): 37-42. [孙承铳, 1964. 家蚕胚胎头部形态的发育研究. 蚕业科学, 2(1): 37-42]

Takeda S, Vieillemaringe J, Geffard M, Rémy C, 1986. Immunohistological evidence of dopamine cells in the cephalic nervous system of the silkworm *Bombyx mori*. Coexistence of dopamine and a endorphin-like substance in neurosecretory cells of the suboesophageal ganglion. *Cell Tissue Res*., 243: 125-128.

Wei ZJ, Hong GY, Jiang ST, Lu C, 2008. Extraction of nuclear proteins from the brains of *Bombyx mori* and electrophoretic mobility shift assay with promoter of PTTH gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(1): 265-271. [魏兆军, 洪桂云, 姜绍通, 鲁成, 2008. 家蚕脑核蛋白抽提及其与 PTTH 基因启动子的凝胶阻滞分析. 中国农业科学, 41(1): 265-271]

Wu DY, Wu JT, Yang XZ, Ao MJ, 1993. Effect of removing silkworm larval suboesophagealganglion on lipid metabolism in pupal stage. *Science of Sericulture*, 19(1): 32-36. [吴大洋, 吴金廷, 杨希哲, 敖明军, 1993. 摘除咽下神经节对家蚕蛹脂质代谢的影响, 蚕业科学, 19(1): 32-36]

Wu ZD, Xu JL, Shen WD, Zhou MZ, Wu FX, Lu SL, 1995. Silkworm Anatomy and Physiology. Agriculture Press, Beijing. 127-129. [吴载德, 徐俊良, 沈卫德, 周明哲, 吴馥香, 吕顺霖, 1995. 蚕体解剖生理学. 北京: 农业出版社. 127-129]

Xia QY, Guo YR, Zhang Z *et al*., 2009. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326(5951): 433-436.

Xia QY, Zhou ZY, Lu C *et al*., 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937-1940.

Xia ZD, Xu JF, 1964. Studies on the neurosecretion of the silkworm, *Bombyx mori* L. Ⅰ. Histological studies on the neurosecretory cells of the brain in the silkworm. *Acta Entomologica Sinica*, 13(5): 671-678. [夏振铎, 徐静斐, 1964. 关于家蚕神经内分泌的研究Ⅰ. 家蚕脑神经分泌细胞的组织学研究(初报). 昆虫学报, 13(5): 671-678]

Yamagata T, Sakurai T, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Kanzaki R, 2008. GFP labeling of neurosecretory cells with the *GAL4/UAS* system in the silkmoth brain enables selective intracellular staining of neurons. *Zool. Sci*., 25(5): 509-516.

Yin HF, Wang QJ, Li N, 2002. The research progress in the disease model of knock-out mouse. *Hereditas*, 24(4): 463-469. [尹海芳, 王秋菊, 李宁, 2002. 基因敲除鼠疾病模型的研究进展. 遗传, 24(4): 463-469]

Yu LL, Cui YJ, Lang GJ, Zhang MY, Zhang CX, 2010. The ionotropic γ-aminobutyric acid receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome*, 53(9): 688-697.

Yu XM, Zhou Q, Li SC, Luo QB, Cai YM, Lin WC, Chen H, Yang Y, Hu SN, Yu J, 2008. The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PLoS ONE*, 3(8): 1-11.

Zeng FH, Xie HX, Nie ZM, Chen J, Lv ZB, Chen JQ, Wang D, Liu LL, Yu W, Sheng Q, Wu XF, Zhang YZ, 2009. Characterization of the gene *BmEm4*, a homologue of *Drosophila E(spl)m4*, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Funct. Genom*., 2009: 1-12.

Zhang TY, Kang L, Zhang ZF, Xu WH, 2004. Identification of a POU factor involved in regulating the neuron-specific expression of the gene encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in *Bombyx mori*. *Biochem. J*., 380(1): 255-263.

Zhou QS, Yu Q, Liu QX, 2011. Progress and application prospect of transgenic silkworm. *Acta Entomologica Sinica*, 54(2): 197-210. [周启升, 于奇, 刘庆信, 2011. 转基因家蚕的研究进展及应用前景. 昆虫学报, 54(2): 197-210]

Zhou QX, Zhang TY, Xu WH, Yu LL, Yi YZ, Zhang ZF, 2008. Analysis of four *achaete-scute* homologs in *Bombyx mori* reveals new viewpoints of the evolution and functions of this gene family. *BMC Genetics*, 9: 24-36.

(责任编辑: 袁德成)